©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Induktionskinetik der Chlorophyllfluoreszenz unterkühlter und gefrorener Blätter von *Rhododendron ferrugineum* beim Übergang vom gefrierempfindlichen zum gefriertoleranten Zustand

Von W. M. WALTER LARCHER und MONIKA NAGELE

Mit 3 Abbildungen

(Vorgelegt in der Sitzung der mathem.-naturw. Klasse am 13. Dezember 1985)

1. Einleitung

Die Pflanzen winterkalter Gebiete erfahren im Herbst eine Steigerung ihrer Frostresistenz, der ein Übergang des Protoplasmas zum gefriertoleranten Zustand zugrunde liegt. In diesem Zustand sind die pflanzlichen Gewebe imstande, extrazelluläre Eisbildung bei fortlaufender Einstellung des thermodynamischen Gleichgewichts zwischen dem gebildeten Eis und dem noch ungefrorenen Wasser bis zu einem spezifischen Ausmaß zu überleben. Überschreitet die Dehydratationsbelastung einen kritischen Grenzwert, so kommt es schließlich doch zum Zelltod. Gefrierempfindliche Zellen werden hingegen plötzlich letal geschädigt, sobald eine intensive Eisbildung im Gewebe nachweisbar wird (Näheres über Resistenzkategorien bei LARCHER, 1982). Der Erwerb von Gefriertoleranz im Herbst und deren Verlust im Frühjahr, der besonders bei Holzpflanzen den Jahresperiodismus der Frostresistenz prägt, beruht auf einer Vielfalt von Veränderungen auf organismischem, cytologischem, ultrastrukturellem und molekularem Niveau (ausführliche Darstellungen bei TUMANOV, 1979; LEVITT, 1980; SIMINOVITCH, 1981; STEPONKUS, 1981; LARCHER, 1985; CARTER und BRENNER, 1985). Unter den verschiedenen Abhärtungsmechanismen verdienen die Veränderungen in der Feinstruktur und dem Chemismus der Biomembranen besondere Beachtung (STEPONKUS, 1979; SENSER und BECK, 1984).

Ein für Pflanzen bezeichnender membrangebundener Prozeß ist die Energieumwandlung mit anschließendem Elektronentransfer bei der Photosynthese. Es ist seit langem bekannt, daß die Photosyntheseaktivität immergrüner Holzpflanzen zeitgleich mit der herbstlichen Abhärtungsphase abnimmt (bei *Rhododendron ferrugineum:* SCHWARZ, 1971; Referate: LARCHER und BAUER, 1981; ÖQUIST, 1983). Als Indikator für membranabhängige Veränderungen in der Photosynthesefunktion hat sich der Verlauf der Chloroplastenfluoreszenz zu Beginn der Belichtung nach vorangegangener Dunkelheit erwiesen (MURATA et al., 1975; RENGER und SCHREIBER, 1986; SIVAK und WALKER, 1985). Unterschiede in der Fluoreszenzkinetik bei frostabgehärteten und nicht abgehärteten Pflanzen wurden *in vitro* und *in vivo* mehrfach gemessen

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

und analysiert (KLOSSON und KRAUSE, 1981; KRAUSE und KLOSSON, 1983; PUKACKI et al., 1983; SMILLIE und HETHERINGTON, 1983; HAVAUX und LANNOYE, 1984).

Wir berichten über den Verlauf der variablen Chlorophyll-a-Fluoreszenz der Blätter von *Rhododendron ferrugineum* zu Beginn der herbstlichen Abhärtungsphase vor und beim Gefrieren. Die Untersuchung sollte ein Verfahren erproben, das Information über den zeitlichen Ablauf der Resistenzrhythmik bietet, ohne die Pflanze einem Letalitätstest aussetzen zu müssen. Der Vorteil einer nichtdestruktiven Methode besteht in der Möglichkeit, dieselbe Pflanze auf ihrem natürlichen Standort fortlaufend überwachen zu können.

2. Material und Methodik

Pflanzenmaterial: Zweige der Alpenrose, *Rhododendron ferrugineum* L., von 30 bis 50 cm Länge wurden im Alpengarten Patscherkofel der Universität Innsbruck (1950 m MH.) in der zweiten Oktoberdekade 1985 abgeschnitten. Zu dieser Zeit beginnt bei der Alpenrose unter der Einwirkung regelmäßig auftretender milder Nachtfröste die Umstellung auf das höhere Resistenzniveau. Dann gelingt es am besten, sowohl empfindliche (nach Wärmebehandlung) als auch tolerante Versuchsproben (nach mehrtägiger Frostbehandlung) vom gleichen Strauch zu gewinnen (PISEK und SCHIESSL, 1947; Abb. 1). Nach der Entnahme wurden die Zweige zunächst eine Woche bei Temperaturen von + 15°C bei Tag und + 2 bis + 3°C bei Nacht wassergesättigt. Fünf Tage vor Beginn der Messungen wurde die Hälfte der Proben zur Rückführung in den gefrierempfindlichen Zustand bei durchgehend + 20°C aufgestellt, die andere Hälfte wurde zur Verstärkung der Gefriertoleranz bei − 3 bis − 5°C in einer Klimakammer abgehärtet.

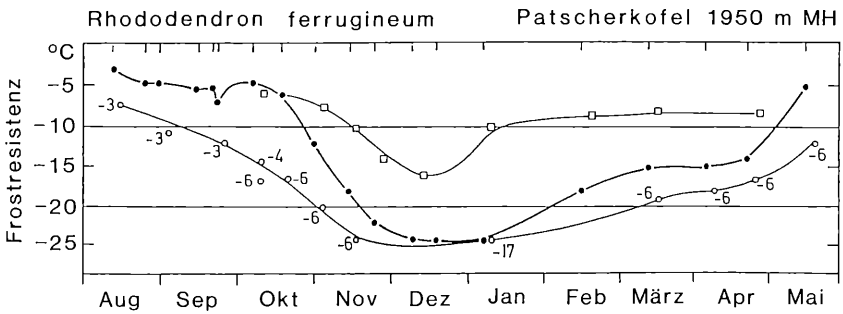


Abb. 1: *Jahresgang der Frostresistenz der Blätter von Rhododendron ferrugineum.* (●) direkt vom Standort, (○) nach mehrtägiger Abhärtung bei den angegebenen Temperaturen und (□) nach Enthärtung bei 15 bis 17°C. Als Maß für die Frostresistenz gilt die Temperatur, bei der rund 10% der Blätter Schädigungen zeigen. Nach PISEK und SCHIESSL (1947).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Analyse des Gefrierverhaltens: Die Unterkühlbarkeit, der Verlauf der Eisbildung im Gewebe und der Eintritt der Frostschädigung von abgehärteten und enthärteten Blättern wurde nach dem Prinzip der Exothermenanalyse (LARCHER, 1987) in Vorversuchen bestimmt. Der Gefrierprozeß wurde durch Registrierung der Blattemperatur bei einer Abkühlungsgeschwindigkeit von 2 $K.min^{-1}$ über ein Kupfer-Konstanten-Thermoelement in Verbindung mit einem Digitalvoltmeter mit Verstärker und einem Linienschreiber (Goerz, Minigor 510) erfaßt. Zur Feststellung der Resistenzkategorie wurde an verschiedenen Stellen des Exothermenverlaufs der Gefrierprozeß durch schnelle Entnahme und Auftauen des Blattes unterbrochen und das Ausmaß der eingetretenen Schädigung nach einem Tag visuell und über die Elektrolytleitfähigkeit des Eluats (WTW-Gerät, LF 91) bestimmt.

Aufnahme der Fluoreszenzkinetik: Der Verlauf der prompten Chlorophyll-a-Fluoreszenz der Blätter wurde durch ein mobiles Computerfluorometer (LARCHER und CERNUSCA, 1985) unter Verwendung des Meßkopfes eines Fluorometers der Firma Brancker (Ottawa) ausgelöst, ausgewertet und ausgedruckt. Die Excitationsbeleuchtung im Bereich von 630 bis 720 nm betrug 8 bis 10 μmol Photonen $m^{-2}.s^{-1}$ (gemessen mit Quantum Meter LI-185 LI-COR, LAMBDA Instruments Nebraska, mit Sensor SR NC Q2421-7711). Die Aufnahme der Fluoreszenztransienten bei Abkühlung und beim Gefrieren wurde in zwei Varianten durchgeführt: Bei progressiver Kühlung wurde der Meßkopf mit dem angeklammerten Blatt thermisch gepuffert im Kühlfach einer feingeregelten Gefriertruhe bei einer Geschwindigkeit von 0,5 bis 1 $K.min^{-1}$ bis zum vollständigen Ausfrieren abgekühlt, wobei nach jeweils zehn Minuten Dunkelintervall Transienten aufgenommen wurden. In einer zweiten Variante wurde der Meßkopf mit dem Blatt bei einer durchschnittlichen Geschwindigkeit von 0,3 $K.min^{-1}$ auf vorgewählte Zieltemperaturen (+ 5, − 3 und − 12°C) abgekühlt und dort zwei bis drei Stunden zur Gleichgewichtseinstellung belassen. Sodann wurden nach unterschiedlichen Dunkelintervallen (60, 30, 15 und 10 Minuten) die Transienten ausgelöst. Bei allen Versuchen wurde zur Temperaturmessung und zur Erfassung der Gefrierexotherme an der Blattunterseite ein Thermoelement montiert. Nach Abschluß der Messung wurde jedes Blatt nach wenigstens eintägiger Latenz auf Schädigungen befundet. Alle Versuchsansätze wurden in wenigstens vier Wiederholungen durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Gefrierverlauf und Schädigungsgrenzen

Blätter von *Rhododendron ferrugineum* waren, sowohl im enthärteten als auch im abgehärteten Zustand, unter den gegebenen Abkühlungsbedingungen auf − 6 bis − 7°C unterkühlbar (Abb. 2). Nach Beginn des Gefrierens trat eine Exotherme von rund 6 K Höhe auf, die bei etwa − 18°C endete, was darauf hinweist, daß bis dahin das ausfrierbare

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

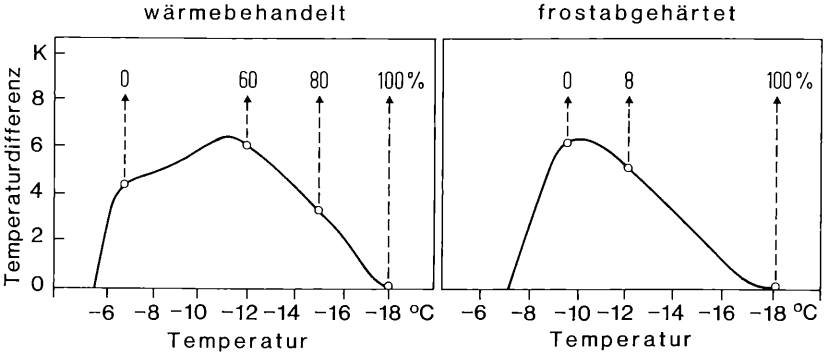


Abb. 2: *Differentialthermogramm gefrierender Blätter von Rhododendron ferrugineum nach Wärmebehandlung bei 20°C und nach Frostabhärtung bei − 3 bis − 5°C (Ende Oktober).* Abszisse: Kühlraumtemperatur, Ordinate: Exothermen, dargestellt als Temperaturdifferenz zwischen Blatt und Umgebung. Prozentangaben: Ausmaß der geschädigten Blattfläche zu den markierten Entnahmezeitpunkten.

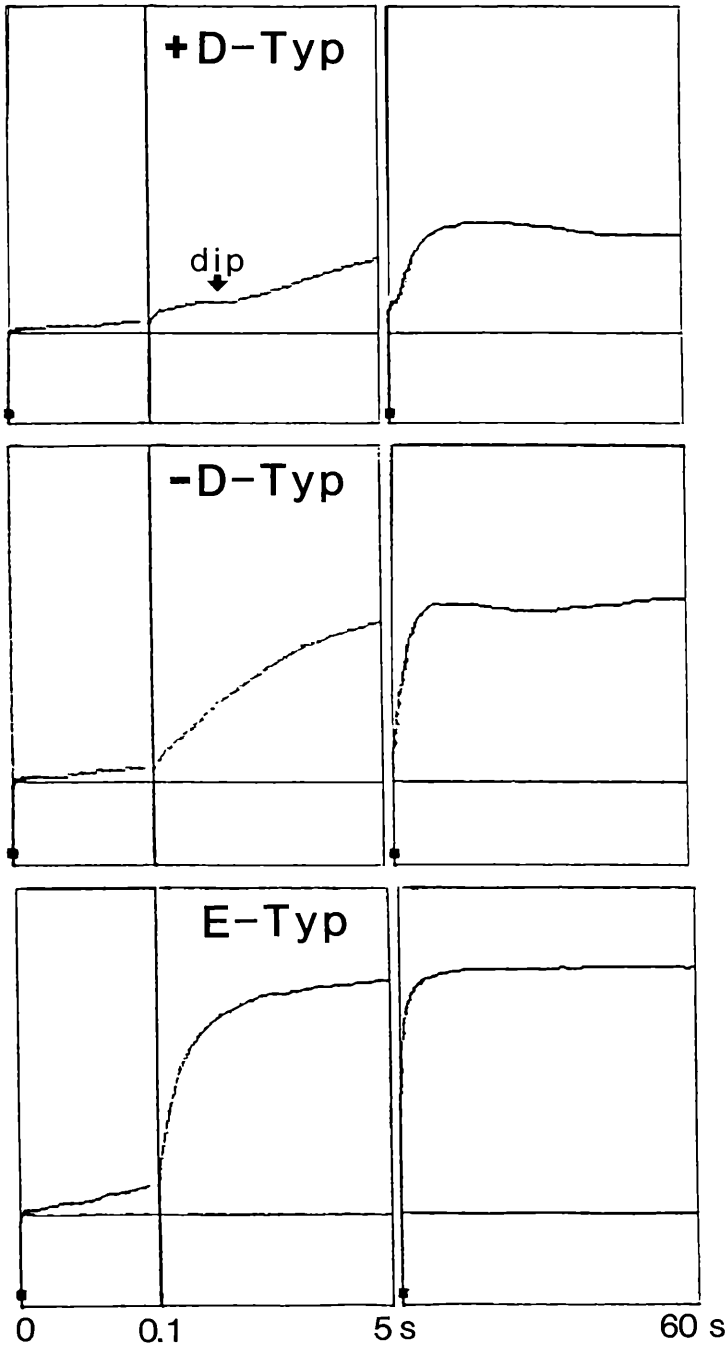
Wasser als Eis auskristallisierte. Die Vitalitätsprüfung an Blättern, die zu verschiedenen Zeitpunkten des Gefrierprozesses entnommen wurden, ergab bei den *warmkonditionierten* Proben die für einen gefrierempfindlichen Zustand charakteristische rasche Zunahme der Schädigung sofort nach Beginn der Eisbildung: unmittelbar nach Erreichen des Exothermengipfels war mehr als die Hälfte des Mesophylls erfroren. *Frostabgehärtete* Blätter, die im Bereich des Exothermenmaximums entnommen wurden, waren überwiegend ungeschädigt. Erst als ein großer Teil des ausfrierbaren Wassers vereist war, breitete sich die Schädigung stark aus. Dieses Gefrierverhalten entspricht dem gefriertoleranten Zustand.

3.2. Änderungen im Verlauf der Fluoreszenzkinetik bei Abkühlung und beim Gefrieren

Mit sinkender Temperatur tritt der Gipfelwert des Fluoreszenztransienten später auf und der Abfall zur stationären Endphase wird flacher: Bei + 20°C wird der Gipfel des Transienten 5 bis 6 s nach Belichtungsbeginn, bei − 3°C erst nach 12 bis 15 s erreicht. Diese Tendenz ist sowohl bei den wärmebehandelten als auch bei den frostabgehärteten *Rhododendron*blättern feststellbar. Bei Temperaturen zwischen + 5°C und der Unterkühlungsgrenze sind im Verlauf des

Abb. 3: *Typische Fluoreszenztransienten unterkühlter und gefrorener Blätter von Rhododendron ferrugineum.* **Oben:** Unterkühltes gefriertolerantes Blatt bei − 5°C; der Pfeil bezeichnet die Abflachung (dip D) in der Anstiegsphase des Transienten. **Mitte:** Unterkühltes wärmebehandeltes Blatt bei − 3°C. **Unten:** Gefrorenes gefriertolerantes Blatt bei −12°C. *Abszisse:* Zeitablauf des Meßvorgangs. *Ordinate:* Fluoreszenzintensität; das schwarze Quadrat markiert den Startpunkt der Fluoreszenzemission. Näheres zur Transientdarstellung bei LARCHER und CERNUSCA (1985).

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at



©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Fluoreszenzanstieges zwei Varianten zu erkennen, die sich durch das Vorhandensein bzw. durch das Fehlen einer kurzen Abflachung (dip D) innerhalb von 2 s nach Belichtungsbeginn unterscheiden. Wir bezeichnen diese Varianten im Folgenden als Typ + D und Typ − D (Abb. 3). Sobald sich Eisbildung im Blatt durch das Auftreten einer Exotherme bemerkbar macht, steigt die Chlorophyllfluoreszenz nach Belichtungsbeginn steil auf das Maximalniveau an, von dem sie nicht mehr abfällt; derartige Transienten bezeichnen wir als Typ E.

3.3. Unterschied im Fluoreszenzverhalten zwischen wärmebehandelten und frostabgehärteten *Rhododendron*blättern

Im *gefrorenen* Zustand tritt bei allen Blättern ein Transient vom Typ E auf, gleichgültig ob dabei eine Schädigung erfolgte oder nicht. Eine Unterscheidung zwischen gefrierempfindlichen und gefriertoleranten Blättern ist weder aus der Form noch aus der Höhe eines E-Transienten möglich. Im *unterkühlten* Zustand kommen Transienten vom Typ + D und − D vor. Wertet man die Häufigkeitsverteilung der beiden D-Typen aus (Tabelle 1), so zeigt sich, daß im Unterkühlungsbereich bis − 6°C an

Tabelle 1: Häufigkeitsverteilung der verschiedenen Verlaufstypen der variablen Chlorophyllfluoreszenz von *Rhododendron*blättern im Oktober

Phase im Abkühlungsprozeß	Temperaturspanne	Anzahl der Blätter pro Transienttyp nach Warmbehandl.			nach Frostabhärtung		
		+ D	− D	E	+ D	− D	E
Unterkühlungsbereich	0 bis − 6°C	3	8	0	21	0	0
Übergangsbereich Unterkühlung → Gefr.	− 6,5 bis − 8°C	2	3	7	11	1	9
Weitgehend gefroren	− 8,5 bis − 10°C	0	0	7	0	0	6

gefriertoleranten Blättern nur Transienten vom Typ + D aufscheinen, bei wärmebehandelten Blättern hingegen Transienten des Typs − D häufiger vertreten sind. Im Temperaturbereich von etwa − 6,5 bis − 8°C, in dem die Blätter *auszufrieren beginnen,* kommen alle drei Transienttypen vor: War das unter dem Meßstrahl des Fluorometers befindliche Mesophyllareal zum Meßzeitpunkt gerade noch unterkühlt, so ergab sich einer der D-Transienten; war an der Meßstelle bereits der Vereisungsprozeß im Gange, so entsprach der aufgenommene Transient dem E-Typ.

4. Folgerungen und Ausblick

Für eine Unterscheidung zwischen dem gefrierempfindlichen und dem gefriertoleranten Zustand von *Rhododendron*blättern bieten bisher bewährte Transientmerkmale wie Grundniveau und Höhe der variablen Fluoreszenz oder die Steilheit des Fluoreszenzanstieges, wie sie in der

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Literatur zur Einstufung von Pflanzen nach ihrer Kälteresistenz angewendet wurden (Übersicht bei HAVAUX und LANNOYE, 1985), keinen aussichtsreichen Ansatz. Der einzige Unterschied besteht in der Häufigkeitsverteilung der Transienttypen + D und − D im Unterkühlungsbereich. Eine vorübergehend langsamere Fluoreszenzzunahme während der schnellen Anstiegsphase des Transienten, wie sie z. B. zur Ausbildung des Merkmals D führt, ist auf Reoxidationsvorgänge zurückzuführen, die einen effizienten Energietransfer innerhalb der Thylakoidmembran voraussetzen. HUNER (1985) hat mit biochemischer Methodik eine Steigerung der Kapazität des photosynthetischen Elektronentransports bei der Kälteabhärtung von Winterweizenpflanzen nachgewiesen. Das Vorkommen von Transienten des Typs + D bei den gefriertoleranten Blättern könnte als Ausdruck einer derartigen Umstellung des Photosyntheseapparates gedeutet werden. Solange allerdings Fluoreszenztransienten nicht in allen Details kausal erklärbar sind (KRAUSE und WEIS, 1984) bleibt unentschieden, ob die Häufigkeit des Transienttyps + D als ein Kennzeichen für den Erwerb von Gefriertoleranz aufgefaßt werden darf, ob sie primär auf die jahresperiodische Umstellung der Pflanzen zur Winterruhe zurückzuführen ist oder ob sie auf dem Zusammenwirken beider Prozesse beruht. Die Ergebnisse stellen jedenfalls einen aussichtsreichen Ansatz zu weiteren vergleichenden Untersuchungen an Pflanzen mit verschiedenen Ausprägungsmustern der Frostresistenz dar und sie lassen erwarten, daß es gelingen wird, modifizierende Einflüsse von Witterung und anderen Umweltfaktoren auf den zeitlichen Ablauf der Resistenzrhythmik auf nichtdestruktive Weise mit ausreichender Sicherheit zu erfassen.

Dank

Der Österreichischen Akademie der Wissenschaften danken wir für die Bereitstellung einer Subvention zur Entwicklung des Computerfluorometers. Für die Mithilfe bei der Versuchsdurchführung danken wir Frau Elisabeth Ralser.

Zusammenfassung

An Blättern von *Rhododendron ferrugineum* wurden Fluoreszenztransienten während der herbstlichen Abhärtungsphase bei fortschreitender Abkühlung und beim Gefrieren aufgenommen. Im unterkühlten Zustand tritt eine Abflachung (dip D) in der steilen Anstiegsphase der variablen Fluoreszenz sehr viel häufiger bei gefriertoleranten Blättern als an gefrierempfindlichen Blättern auf. Im gänzlich gefrorenen Zustand zeigen alle Blätter einen gleichartigen, charakteristischen Transienttyp. Im Übergangsbereich zwischen Unterkühlung und Eisbildung herrscht Zufallsverteilung unter den Transienttypen. Diese Ergebnisse ermutigen zu weiteren Bemühungen, die Fluoreszenztechnik als nichtdestruktive Methode zur Bestimmung des zeitlichen Verlaufs der Resistenzrhythmik von Pflanzen auf ihrem Standort auszubauen.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

Literatur

CARTER, J. V. & BRENNER, M. L. (1985): Plant growth regulators and low temperature stress. In: PHARIS, R. P., REID, D. M. (eds.): Hormonal regulation of development. III. Role of environmental factors. Encyclopedia of Plant Physiology Bd. 11, 418–433. Springer, Berlin.

HAVAUX, M. & LANNOYE, R. (1984): Effects of chilling temperatures on promt and delayed chlorophyll fluorescence in maize and barley leaves. Photosynthetica *18*, 117–127.

HAVAUX, M. & LANNOYE, R. (1985): In vivo chlorophyll fluorescence and delayed light emission as rapid screening techniques for stress tolerance in crop plants. Z. Pflanzenzüchtg. *95*, 1–13.

HUNER, N. P. A. (1985): Acclimation of winter rye to cold-hardening temperatures results in an increased capacity for photosynthetic electron transport. Can J. Bot. *63*, 506–511.

KLOSSON, R. J. & KRAUSE, G. H. (1981): Freezing injury in cold-acclimated and unhardened spinach leaves. II. Effects of freezing in chlorophyll fluorescence and light scattering reactions. Planta *151*, 347–352.

KRAUSE, G. H. & KLOSSON, R. J. (1983): Effects of freezing stress on photosynthetic reactions in cold-acclimated and unhardened plant leaves. In: MARCELLE, R., CLIJSTERS, H., van POUCKE, M. (eds.): Effects of Stress on Photosynthesis, 245–256. Mijhoff-Junk, The Hague.

KRAUSE, G. H. & WEIS, E. (1984): Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. II. Interpretation of fluorescence signals. Photosynth. Res. *5*, 139–157.

LARCHER, W. (1982): Typology of freezing phenomena among vascular plants and evolutionary trends in frost acclimation. In: LI, P. H., SAKAI, A. (eds.): Plant cold hardiness and freezing stress, Bd. II, 417–426. Academic Press, New York.

LARCHER, W. (1985): Kälte und Frost. In: SORAUER, P. (Begr.): Handbuch der Pflanzenkrankheiten Bd. I, 5. Lf., 7. Auflage, 107–320. Parey, Berlin.

LARCHER, W. (1987): Kälteresistenz. In: KREEB, K. H. (Hrsg.): Methoden der Pflanzenökologie, 2. Auflage. VEB Fischer, Jena, in Druck.

LARCHER, W. & BAUER, H. (1981): Ecological significance of resistance to low temperature. In: LANGE, O. L., NOBEL, P. S., OSMOND, C. B., ZIEGLER, H. (eds.): Physiological Plant Ecology I. Encyclopedia of Plant Physiology, Bd. 12 A, 403–437. Springer, Berlin.

LARCHER, W. & CERNUSCA, A. (1985): Mikrocomputergesteuerte mobile Anlage zum fluorometrischen Nachweis von Photosynthesestörungen. Sitzungsber. Österr. Akad. Wiss., Math.-naturw. Kl., Abt. I, *194*, 45–64.

LEVITT, J. (1980): Responses of plants to environmental stresses. Bd. I. Chilling, freezing, and high temperature stresses. 2. Aufl. Academic Press, New York.

MURATA, N., TROUGHTON, J. H. & FORK, D. C. (1975): Relationships between the transition of the physical state of membrane lipids and photosynthetic parameters in Anacystis nidulans and lettuce and spinach chloroplasts. Plant Physiol. *56*, 508–517.

ÖQUIST, G. (1983): Effects of low temperature on photosynthesis. Plant, Cell and Env. *6*, 281–300.

©Akademie d. Wissenschaften Wien; download unter www.biologiezentrum.at

PISEK, A. & SCHIESSL, R. (1947): Die Temperaturbeeinflußbarkeit der Frosthärte von Nadelhölzern und Zwergsträuchern an der alpinen Waldgrenze. Ber. Naturwiss.-med. Ver. Innsbruck *47:* 33–52.

PUKACKI, P., VESELOVSKY, V. A. & VESELOVA, T. V. (1983): Effect of cold deacclimation on delayed fluorescence of spruce needles. Z. Pflanzenphysiol. *109,* 267–273.

RENGER, G. & SCHREIBER, U. (1986): Practical application of fluorometric methods to algae and plant research. In: AMESZ, J., FORK, D. C., GOVINDJEE (eds.): Light emission by plants and bacteria. Academic Press, New York.

SCHWARZ, W. (1971): Das Photosynthesevermögen einiger Immergrüner während des Winters und seine Reaktivierungsgeschwindigkeit nach scharfen Frösten. Ber. Dtsch. Bot. Ges. *84,* 585–594.

SENSER, M. & BECK, E. (1984): Correlation of chloroplast ultrastructure and membrane lipid composition to the different degrees of frost resistance achieved in leaves of spinach, ivy, and spruce. J. Plant Physiol. *117,* 41–55.

SIMINOVITCH, D. (1981): Common and disparate elements in the processes of adaption of herbaceous and woody plants to freezing – a perspective. Cryobiology *18,* 166–185.

SIVAK, M. N. & WALKER, D. A. (1985): Chlorophyll a fluorescence: can it shed light on fundamental questions in photosynthetic carbon dioxide fixation? Plant, Cell and Environm. *8,* 439–448.

SMILLIE, R. M. & HETHERINGTON, S. E. (1983): Stress tolerance and stress induced injury in crop plants measured by chlorophyll fluorescence in vivo. Plant Physiol. *72,* 1043–1050.

STEPONKUS, P. L. (1979): Effects of freezing and cold acclimation on membrane structure and function. In: MUSSELL, H., STAPLES, R. C. (eds.): Stress physiology of crop plants, 143–158. Wiley, New York.

STEPONKUS, P. L. (1981): Responses to extreme temperatures. Cellular and subcellular bases. In: LANGE, O. L. et al. (eds.): Physiological plant ecology I. Encyclopedia of plant physiology, Bd. 12 A, 371–402. Springer, Berlin.

TUMANOV, I. I. (1979): Fiziologija zakalivanija i morozostoikosti rastenii. Izdat. Nauka, Moskva.